

**PRV**PATENT- OCH REGISTRERINGSVERKET  
Patentavdelningen

REC'D 17 NOV 1999

WIPO PCT

**Intyg  
Certificate**

SE 99/1486

EJU

Härmed intygas att bifogade kopior överensstämmer med de handlingar som ursprungligen ingivits till Patent- och registreringsverket i nedannämnda ansökan.

This is to certify that the annexed is a true copy of the documents as originally filed with the Patent- and Registration Office in connection with the following patent application.

(71) Sökande Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala SE  
Applicant (s)

(21) Patentansökningsnummer 9802882-2  
Patent application number

(86) Ingivningsdatum 1998-08-28  
Date of filing

Stockholm, 1999-11-08

För Patent- och registreringsverket  
For the Patent- and Registration Office

Anita Södervall

Avgift  
Fee

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Slutversion 1998-08-24

## KOMPOSITMATERIAL OCH DESS ANVÄNDNING.

### Teknikområde

Uppfinningen handlar om kompositmaterial i vilka ingår superporösa polysackaridmaterial av den typ som tidigare  
5 beskrivits i WO-A-9319115 (US-A-5,723,601).

Superporösa polysackaridmaterial innehåller två typer av porer. Dels porer med liten diameter (oftast mindre än 0,05 mikrometer, mikroporer), där masstransporten sker med diffusion. Dels stora porer - superporer - i vilka  
10 masstransport kan ske genom ett konvektivt flöde när porerna är öppna. Den del av materialet som ligger utanför superporerna kallas gelfasen och innehåller således mikroporerna.

I en serie av artiklar har vi beskrivet superporösa  
15 agarosmatriser. Se Gustavsson et al., J. Chromatog. A 734 (1996) 231-240, Gustavsson et al., J. Chromatog. A 776 (1997) 197-203, Gustavsson et al., J. Chromatog. A 795 (1998) 199-210.

Tidigare känt är att placera superporös agaros i porerna  
20 av högporöst elektriskt ledande material (reticulated vitrous carbon, RVC) för att öka materialets kapacitet för att binda affinitetsbindande ligander. Se Khayyami, Thesis "Biosensors and chromatographic supports based on new combinations of conductive material", Lund University, Lund  
25 (1996). Användningsområdena har varit som biosensorer eller som kromatografiadsorbenter som skall kunna elektroeluera. Agaros ensamt är oanvändbar vid den aktuella typen av biosensorer och elektroeluering. Med elektroeluering avses att en bindande ligand på elektrokemisk väg  
30 oxideras/reduceras till att bli icke-bindande så att eluering möjliggöres.

Tyvärr har man ännu inte till fullo kunnat utnyttja superporösa polysackaridmaterial på det sätt som vore önskvärt. Sålunda önskar man ofta att matrisernas  
35 egenskaper skall vara bättre med avseende på fysisk stabilitet (trycktåliga), separationsegenskaper vad gäller att diskriminera mellan substanser med olika molvikt och

Slutversion 1998-08-24

geometrisk form, stabilitet hos affinitetsligander som bundits till en superporös matris etc. Speciellt kan nämnas att vissa applikationer, speciellt de som fodrar matris i partikulär form, skall ha en densitet som mer eller mindre kraftigt avviker från  $1 \text{ g/cm}^3$ .

Vi har nu upptäckt att man mycket lätt kan tillverka kompositmaterial i vilka en superporös polysackaridmatris ingår som materialets huvudkomponent och att detta kan erbjuda fördelar med avseende på ovan nämnda brister hos tidigare kända superporösa polysackaridmaterial.

### Uppfinningen

En första aspekt av uppfinningen är en komposit som består av två eller flera komponenter som kännetecknas av att det superporösa polysackaridmaterialet ingår som en av komponenterna (huvudkomponent). Övriga komponenter kallas bikomponenter (bikomponent 1, 2, 3 etc). I denna aspekt av uppfinningen ingår inte att uppfinningens komposit innehåller en elektriskt ledande monolitisk bikomponent som avses kopplas eller som är kopplad mellan två elektroder.

En andra aspekt av uppfinningen är kompositens användning vid separationer, odling av celler, kemisk syntes på fast fas, och genomförande av enzymatiska/katalytiska reaktioner där enzymet är bundet till kompositen enligt uppfinningen (uppfinningens förfarandeaspekt).

Kompositen kan vara i form av fibrer, kulor (pärlor, partiklar), eller en monolit. Som exempel på monolit kan nämnas membran eller en gjuten kontinuerlig kromatografibädd. Vid matriser i form av kulor talar man vanligen om storlekar i intervallet  $0,1\text{-}1000 \text{ }\mu\text{m}$ , såsom  $1\text{-}1000 \text{ }\mu\text{m}$  eller  $5\text{-}500 \text{ }\mu\text{m}$ .

### Huvudkomponenten (superporöst polysackaridmaterial)

Typiska superporösa polysackaridmaterial är ofta tillverkade utgående från agar, agaros, alginat, dextran,

Slutversion 1998-08-24  
 carageenan, chitosan, cellulosa och stärkelse. Vilket material som väljes i varje aktuellt fall bestäms ofta av de egenskaper man vill att slutprodukten skall ha med avseende på porstorlek, laddning, stabilitet i olika media, 5 kostnader etc. Superporösa polysackaridmaterial för användning i uppfinningen kan framställas på samma sätt som anges i WO-A-9319115.

Benämningen superporer avser att ett flöde som ger konvektiv masstransport skall kunna appliceras genom 10 porerna. Detta betyder som regel att det skall finnas porer med diametrarna som är i intervallet 0,5-1000  $\mu\text{m}$ , med ett föredraget intervall på 1-100  $\mu\text{m}$ . För matriser i form av partiklar som packats till en bädd gäller dessutom villkoret att förhållandet mellan superpordiameter och 15 partikeldiametern är i intervallet 0,01-0,3, med företräde för 0,05-0,2.

Andelen huvudkomponent i uppfinningens komposit kan variera inom mycket vida gränser. Baserat på torrsvikt kan således andelen huvudkomponent variera från strax över 0% till 20 strax under 100%, såsom 0,01-99,99% (w/w). Baserat på volym och mått på komposit mättad med vatten kan huvudkomponenten utgöra 5-99,99%, såsom 50-99% (v/v).

## 25 Bikomponenter

Kompositens bikomponenter kan vara a) partiklar som är i inneslutna i huvudkomponentens gelfas och/eller i superporerna, eller b) en kontinuerlig fas i superporerna, eller c) polymera kedjor som är homogent blandade i 30 gelfasen med huvudkomponentens polysackariden. I varianten a) ingår partiklar som belagts med superporöst polysackaridmaterial. I varianten b) ingår att en makroporös bikomponent helt omsluter det superporösa polysackaridmaterialiet.

35 Bikomponenter skiljer sig från huvudkomponenten med avseende på minst en egenskap. Bikomponenterna kan vara valda bland olika organiska och oorganiska material. De kan

Slutversion 1998-08-24

vara polymera med rent syntetiskt ursprung eller vara baserade på s.k. biopolymerer, exempelvis polysackarid av samma eller olika slag som de som är aktuella som huvudkomponent. De kan vara derivatiserade till att uppvisa

5 olika grupper som utnyttjas vid användningen av uppfinningens kompositmaterial. En bikomponent kan i uppfinningens komposit föreligga som fast substans eller vätska och är som regel olöslig i vatten (utan tillsatser som förändrar lösligheten).

10 En bikomponent kan vara porös. Om en bikomponent är porös kan dess medelpordiameter (i kompositen) vara större eller mindre än eller densamma som medelpordiametern hos mikroporerna i huvudkomponentens gelfas.

Bikomponenter kan ha en densitet som mer eller mindre  
15 starkt avviker från  $1 \text{ g/cm}^3$ .

Som exempel på den stora variabilitet som gäller bikomponenter kan hänvisas till WO-A-9200799. Man kan också nämna följande funktioner som kan tillföras kompositen via en bikomponent:

- 20 • Densitet, t ex partiklar med hög eller låg täthet.
- Magnetiskt påverkbara, t ex partiklar av magnetit.
- Affinitetsfunktion, beskrives närmare i nästa avsnitt.
- Mekanisk stabilitet, t ex polymerer, partiklar eller kontinuerliga strukturer som reticulated vitreous carbon
- 25 (RVC).
- Termisk stabilitet, t ex polymerer eller andra reagens som stabiliserar huvudkomponent 1:s smältpunkt
- Fotokemisk stabilitet, t ex tillförsel av kraftigt färgade partiklar
- 30 • Mikrobiell stabilitet, t ex polymerer som förhindrar tillträde av mikroorganismer/hydrolytiska enzymer.
- Elektrisk ledningsförmåga, t ex elektriskt ledande polymerer, i partikulär eller monolitisk form. Speciellt det fall att en elektriskt ledande bikomponent är
- 35 monolitisk och kopplad mellan två elektroder ingår ej i uppfinningens komposit.

Slutversion 1998-08-24

- Porstorleksmodifiering, t ex polymera nätverk som minskar storleken av superporerna i huvudkomponenten.
- Värmeledningsförmåga, t ex partiklar eller värmeledande strukturer som reticulated vitreous carbon som snabbt kan  
5 föra bort eller tillföra värme.
- Variabla kompositegenskaper, tex via så kallade smart polymers. Smart polymers är polymerer som dramatiskt kan ändra sina egenskaper som resultat av ett yttre stimuli. Ett exempel är att till införa en termoresponsiv smart  
10 polymer i superporerna och därmed göra dessa variabelt permeabla via små temperaturförändringar.

#### Derivatiserade former av uppfinningens kompositmaterial

Uppfinningens komposit kan vara försedd med s.k.

- 15 affinitetsligander vilka är bundna till huvudkomponenten och/eller till en eller flera av kompositens bikomponenter. Som exempel på affinitetsligander kan nämnas anjon- eller katjonbytande grupp, amfotär grupp, kelaterande grupp, bioaffin grupp, grupp som kan utnyttjas vid kovalent  
20 kromatografi, grupp som ger  $\pi$ - $\pi$ -interaktion, grupp som kan utnyttjas vid hydrofob interaktionskromatografi, grupp som ger tiofila interaktioner, affinitetsbindande oorganiskt material exempelvis hydroxyapatit, etc.

De olika komponenterna i uppfinningens komposit kan, när  
25 de är baserade på polymerer, vara tvärbundna på i och för sig känt sätt.

Tvärbindning och införande av affinitetsligander kan ske i den färdiga kompositen eller i respektive huvudkomponent innan kompositen bildas.

- 30 Det framgår ovan att tvärbindande strukturer, införda ligander och andra bindande strukturer som uppkommit genom kemisk derivatisering av ett basmaterial inte kallas bikomponent i samband med uppfinningen.

#### 35 Framställning av uppfinningens kompositmaterial

Slutversion 1998-08-24

Kompositen enligt uppfinningen kan framställas genom att man först gör en lösning av den polysackarid som skall utgöra huvudkomponenten i den färdiga kompositen samt suspenderar ner partiklar av bikomponent 1, 2, 3, etc i 5 lösningen och därefter förfar som är känt vid framställning av superporöst polysackaridmaterial enligt WO-A-9319115. Det är väsentligt att man tillser så att bikomponenterna 1, 2, 3 etc ej sedimenterar ut under tillverkningsprocessen.

En komposit enligt uppfinningen kan även framställas 10 genom att man a) utgår från superporöst polysackaridmaterial (huvudkomponent) framställt enligt WO-A-9319115 samt inför bikomponenterna 1, 2, 3 etc i superporerna, eller b) utgår från en makroporös bikomponent och tillverkar det superporösa polysackaridmaterialet 15 (huvudkomponent) i porerna till den makroporösa bikomponenten.

#### Uppfinningens användningsområden

Uppfinningens komposit har potentiellt samma 20 användningsområden som andra tidigare kända porösa material. Några aktuella områden är bland annat i samband med separationer, cellodling, bioreaktorer och kemisk syntes. Exempel på aktuella bioreaktorer är bl.a. enzymreaktorer och andra reaktorer där katalysatorn är 25 bunden till en matris. Exempel på aktuella kemisk synteser är syntes av polymerer på fast fas, såsom av oligopeptider och oligonukleotider. Vid cellodling kan cellerna få växa på uppfinningens komposit.

Med separationer avses främst separationer baserade på 30 affinitet mellan den substans som skall frånsepareras och en struktur (ligand) i uppfinningens matris eller baserade på olikheter i geometrisk form och molvikt mellan olika substanser. Dessa separationer kan ske i form av kromatografiska eller satsvisa förfaranden eller 35 förfaranden som bygger på membranteknologi. Enligt den första varianten får en lösning innehållande substanser som skall separeras från varandra passera en bädd som

Slutversion 1998-08-24

innehåller uppfinningens komposit. Badden kan vara i form av en porös monolitisk matris, packade partiklar eller en s.k. expanderad bädd (se WO-A-9218237). Vid satsvisa förfaranden är uppfinningens komposit i form av partiklar  
 5 som är suspenderade i den lösning som innehåller de substanser som skall separeras från varandra. Eluering/desorption/frisättning av bunden substans kan sedan bl.a. genom tillsats av lösningar som stör bindningen mellan ligand och bunden substans. Beroende på typ av  
 10 ligand kan lösningen innehålla desorberande agens som ger förhöjd jonstyrka, förändrat pH, eller som direkt konkurrerar med bindning mellan ligand och bunden substans. Elektroeluering som utnyttjar en komposit med en monolitisk elektriskt ledande bikomponent, som är kopplad mellan två  
 15 elektroder, i kombination med elektroeluering ingår ej i uppfinningens förfarandeaspekt.

I princip kan bäddar uppbyggda på liknande sätt användas vid odling av celler, kemisk syntes och i bioreaktorer.

20 Uppfinningen definieras ytterligare av bifogade patentkrav och skall nu åskådliggöras med ett antal icke-begränsande exempel.

25

#### EXPERIMENTELL DEL

I dessa försök har vi utgått från de exempel som ges i den internationella patentansökan WO-A-9319115.

**Exempel 1. Monolitisk komposit. Kontinuerliga superporösa  
 30 membraner med fyllmaterial i gelfasen.**

- 10 ml av en 6 % agaros lösning framställdes enligt exempel 1 i WO-A-9319115 (lösning A).
- 10 ml cyklohexan + 1 ml Tween-80 framställdes enligt exempel 1 i WO-A-9319115 (lösning B)
- 35 • 10 ml fyllmaterial värmdes till 60°C (lösning C).



Slutversion 1998-08-24

Lösning A och lösning C blandades under omrörning vid 60°C. Därefter tillsattes lösning B under omrörning (1000 rpm) vid 60°C för att få emulsion 1 på samma sätt som beskrivs i WO-A-9319115. Av emulsion 1 framställdes sedan 5 superporösa kontinuerliga kompositmembraner enligt exempel 4 i WO-A-9319115.

Följande alternativa fyllmaterial användes:

- a. Anjonbytare, AG 1X-8 minus 400 mesh (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.). Den resulterande kompositen visades fungera genom bestämning av genomgrottskurva för ATP.
- b. Silikamaterialet LiChroprep Si 100, 40-63  $\mu\text{m}$  (E. Merck Darmstadt, Tyskland).
- 15 c. Agaroskolor (6% agarose 25-75  $\mu\text{m}$ ) derivatiserade med Cibacron-blue. Dessa agaroskolor tillverkades enligt Gustavsson and Larsson, J. Chromatography A, 734 (1996) 231-240, men med en omrörningshastighet på 1500 rpm.
- d. Graphite, powder synthetic, 1-2  $\mu\text{m}$  (Aldrich, U.S.A.). I 20 detta fallet användes 20 ml 6 % agaroslösning och 2,5 ml grafitpulver.

Exempel 2. Komposit i form av kulor/pårlor. Superporösa agaroskolor i vars superporer en lågprocentig agaroslösning 25 gjutits.

Följande superporösa agaroskolor tillverkade enligt WO-A-9319115 användes som utgångsmaterial:

1. Agaroshalt 6 %, Partikelstorlek 300-500  $\mu\text{m}$ ,  
30 superporvolym 40 %, superpordiameter 30  $\mu\text{m}$ .
2. Agaroshalt 6 %, Partikelstorlek 106-180  $\mu\text{m}$ ,  
superporvolym 40 %, superpordiameter 30  $\mu\text{m}$ .

Dessa superporösa agaroskolor användes för att tillverka kompositmaterial genom att fylla superporerna med 0,5% 35 agarose enligt följande:

Slutversion 1998-08-24

- Det interstitiella vattnet hos 20 ml sedimenterade superporösa agaroskylor avfiltrerades på büchnertratt och de superporösa agaroskylorna överfördes till en E-kolv. E-kolven värmdes till 50°C i ett termostaterat vattenbad
- 5 (gel A).
- 0,5 g agaros (low gelling temperature, Sigma A-4018) adderades till 100 ml destillerat vatten och värmdes till 95-100°C i en mikrovågsugn. Agaroslösningen tempererades ner till 50°C i ett termostaterat vattenbad (lösning B).
- 10 • Lösning B adderades till gel A och sattes i ett skakvattenbad (50°C) under 22 timmar (suspension C).
- 200 ml cyklohexan + 5,6 g Span-85 (Fluka, Buchs, Schweiz) tempererades till 50°C i en omrörd tankreaktor. Suspension C adderades till tankreaktorn (50°C) under
- 15 omrörning (1500 rpm). Efter 1 minut sänktes temperaturen i tankreaktorn till 5°C under fortsatt omrörning (1500 rpm).
- I slutsteget bildades det önskade kompositmaterial, dvs superporösa agaroskylor med 0.5 % agaros i superporerna
- 20 samt vanliga agaroskylor med agaroshalt 0.5 %. De senare kunde lätt avskiljas genom sedimentering.

#### **Funktionstest av agaroskompositkylor (6% - 0,5 % agaros):**

- De ovan tillverkade kompositkylorna packades i
- 25 kromatografikylor och användes för gelfiltrering. Dessa kompositkylor kunde separera latexpartiklar (0.5 µm) och Blue Dextran MW 2 000 000, som elueras samtidigt vid gelfiltreringsförsök med kylor packade med vanliga agaroskylor eller superporösa agaroskylor. Förklaringen är
  - 30 att Blue Dextran 2 000 000 har tillgång till superporvolymen medan latexpartiklarna ej har tillgång till den volymen p.g.a. att den är exkluderad från 0.5 % agarosporer. Denna typ av kompositkylor kan användas för att utöka separationsområdet för DNA vid gelfiltrering.

Slutversion 1998-08-24

**Exempel 3. Komposit i form av kulor. Superporösa  
agaros/polyakrylamidkulor.**

**Kommentar.** I denna komposit består själva gelfasen av tvärbunden polyakrylamid + agaros.

5

- 0,0625 g N,N'-methylene-bis-akrylamid löstes i 25 ml 10 % akrylamid. Lösningen vakuumavgasades och tempererades till 60°C (lösning A).
- 2,4 g agaros löstes i 30 ml vakuumavgasat vatten, och  
10 upphettades i mikrovågsugn till 95-100°C. Agaroslösningen tempererades till 60°C i en omrörd tankreaktor (lösning B).
- 25 ml cyklohexan med 1,5 ml Tween-80 avgasades med kvävgas och tempererades till 60°C (lösning C).
- 15 • 150 ml cyklohexan med 8,4 g Span 85 avgasades med kvävgas och tempererades till 60°C (lösning D).

Lösning A blandades ner i lösning B under omrörning (500 rpm, 15 min) vid 60°C (lösning E). 0,05 ml TEMED och 30 mg ammoniumpersulfat, separat lösta i en liten mängd avgasat  
20 vatten, adderades till lösning E under omrörning (500 rpm, 2 min). Lösning C adderades till lösning E och emulgering vid 1000 rpm i 0,5 min. Lösning D adderades till lösning E och emulgering vid 500 rpm i 1 minut, därefter kylning till 25°C. Fortsatt omrörning vid 500 rpm i 30 min.

25

De erhållna gelkulorna tvättades som beskrivs i WO-A-9319115.

**30 Exempel 4. Monolitisk komposit baserad på monolitisk  
mekanisk stödmatrix och superporös  
polysackaridmatrix.**

Som mekanisk stödmatrix användes reticulated vitreous carbon (RVC; Duocell, Energy Research and Generation,  
35 Oakland, CA, USA).

Slutversion 1998-08-24

Emulsion 1 enligt Exempel 1 i WO-A-9319115 höllades ner i en termostatterad glaskolonn (50°C) i vilken en matris av RVC placerats. Kolonnen sänktes ner i ett kylbad varvid  
5 agarosfasen stelnade. Det erhållna kompositmaterialet trimmades i ändarna och tvättades fritt från organsikt lösningsmedel.

Funktionen hos materialet testades i jämförande kromatografistudier med BSA som kromatograferad molekyll.

10

**Exempel 5. Monolitisk komposit baserad på superporös agaros och jästceller.**

En komposit framställdes enligt exempel 1. Som bikomponent användes 10 ml 50 %-ig jästsuspension (bagerijäst). Den  
15 färdiga kompositen undersöktes och befanns ha enzymatisk aktivitet (alkoholdehydrogenasaktivitet).

**Exempel 6. Komposit i form av kulor. Jonbytesmatris.**

- 10 ml 2-6 % agaroslösning framställdes (60°C). Till  
20 lösningen adderades en natriumalginatlösning (4% w/v) till en slutkoncentration av 0.25 - 1 % (w/v) (Lösning A).
- 10 ml cyklohexan + 0.6 ml Tween-80 värmdes till 60°C (lösning B).
- 25 • 50 ml cyklohexan + 2 g Span 85 värmdes till 60°C (lösning C).
- Lösning B adderades till lösning A och omrördes vid 1000 rpm i 2 minuter vid 60°C, (lösning D).

Superporösa alginat-agaroskulor tillverkades enligt

30 följande två metoder:

Metod 1: Lösning D adderades till lösning C i en omrörd tankreaktor (600 rpm, 60°C). Agarosen tilläts stelna efter 1 minut genom kylning av tankreaktorn till 25°C. Alginatet i agarosfasen polymeriserades genom att  
35 en CaCl<sub>2</sub>-vatten lösning (liten volym) adderades till

Slutversion 1998-08-24

tankreaktorn under omrörningen precis innan eller precis efter kylningen.

Metod 2: Lösning D adderades droppvis med en pasteur pipetter i en uppvärmd bägare (60°C). Bägaren innehöll två  
5 faser. Toppfasen bestod av lösning C. Bottenfasen bestod av 1.5 % CaCl<sub>2</sub> i vatten. Bägaren omrördes med en magnetomrörare utan att faserna blandades.

Det framställda kompositmaterialet tvättades med vatten, etanol-vatten (1:1) och vatten

10

---

**Exempel 7. Monolitisk agaros-hydroxyapatit komposit.**

25 ml sedimenterad hydroxyapatit i 1 mM natriumfosfatbuffert underkastades en serie sedimenteringar  
15 under vilka de minsta partiklarna (totalt 9 ml av den sedimenterade hydroxyapatiten) avlägsnades. 5 ml sedimenterad volym av den hydroxyapatit som fanns kvar (1 mM natriumfosfatbuffert pH 6,8) termostatterades till 60°C. 20 ml av en agaroslösning (8% w/v) framställdes genom  
20 värmning under en minut av en suspension agaros i vatten till 95-100°C i en mikrovågsugn. Under uppvärmningen hölls agarospulvret välsuspenderat genom tillfälliga skakningar. Agaroslösningen termostatterades sedan till 60°C, varefter 15 ml sattes till den termostatterade hydroxyapatiten.  
25 Lösningen med agaros-hydroxyapatit omrördes sedan vid 1000 varv per minut i ett termostatterat vattenbad (60°C). Efter 5 minuter tillsattes en blandning av 0,75 ml Tween-80 och 10 ml cyklohexan (60°C). Blandningen emulgerades genom omrörning vid 1000 varv per minut under två minuter.  
30 Emulsionen hölls i glaskolonner (16 mm ID) som hölls termostatterad till 60°C i ett vattenbad. Efter 30 sekunder överfördes glaskolonnerna till ett isbad för att kylas. De olösliga kontinuerliga bäddarna (innehållande hydroxyapatit) som erhöles trimmades till en längd på 1,4

Slutversion 1998-08-24

cm och placerades i glaskolonner (16 mm ID) som var utrustade med flödesadaptorer. Den organiska fasen i superporerna avlägsnades genom att pumpa natriumfosfatbuffert pH 6,8, etanol-1 mM

- 5 natriumfosfatbuffert pH 6,8 (50:50 v/v) och slutligen natriumfosfatbuffert pH 6,8 genom kolonnen. Kompositbädden lagrades vid 4°C till dess att den användes.

Kolonnerna anslöts sedan till ett HPLC-system (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sverige) inkluderande

- 10 pumpar, injektionsventiler, UV-Vis detektor och skrivare.

Separation av tre modellproteiner (lysozym, cytokrom c och bovint serumalbumin) studerades sedan med tre olika flödes hastigheter (15 cm/h, 30 cm/h och 60 cm/h).

- 15 Kompositbädden hade en superpor/interstitiell porositet på 33% (definierad av framställningsmetoden) och en superpor/interstitiell medelpordiameter på 30 µm (mätt genom observation i mikroskop).

Slutversion 1998-08-24

# P A T E N T K R A V

- 5 1. Superporöst polysackaridmaterial, **kännetecknat** av att  
det ingår i en komposit som består av två eller flera  
komponenter av vilka en är superporös polysackarid  
(huvudkomponent) med undantag av det fall att  
kompositen innehåller en elektriskt ledande monolitisk  
10 bikomponent som avses eller är kopplad mellan två  
elektroder.
2. Superporöst polysackaridmaterial enligt krav 1  
**kännetecknat** av att huvudkomponenten är i form av  
15 diskreta partiklar eller kontinuerliga strukturer.
3. Superporöst polysackaridmaterial enligt något av kraven  
1-2, **kännetecknat** av att minst en av kompositens  
bikomponenter finns utanför superporerna men inuti den  
20 första huvudkomponentens gelfas.
4. Superporöst polysackaridmaterial enligt något av kraven  
1-2, **kännetecknat** av att minst en av kompositens  
bikomponenter finns i superporerna.  
25
5. Superporöst polysackaridmaterial enligt något av kraven  
1-2, **kännetecknat** av att minst en av kompositens  
bikomponenter finns i såväl superporerna som i  
huvudkomponentens gelfas.  
30
6. Superporöst polysackaridmaterial enligt något av kraven  
1-5, **kännetecknat** av att kompositen uppvisar minst en  
affinitetsligand.
- 35 7. Superporöst polysackaridmaterial enligt krav 6,  
**kännetecknat** av att respektive affinitetsligand är bunden

Slutversion 1998-08-24

till huvudkomponenten och/eller en eller flera  
bikomponenter.

8. Superporöst polysackaridmaterial enligt krav 6,  
5 **kännetecknat** av att minst en av affinitetsliganderna är  
bunden till huvudkomponenten.
9. Superporöst polysackaridmaterial enligt krav 6,  
**kännetecknat** av att minst en av affinitetsliganderna är  
10 bunden till någon av bikomponenterna.
10. Superporöst polysackaridmaterial enligt något av kraven  
4-7, **kännetecknat** av att minst en av affinitetsliganderna  
är en jonbytande grupp, amfotär grupp, kelaterande grupp,  
15 bioaffin grupp, grupp som kan utnyttjas vid kovalent  
kromatografi, grupp som ger  $\pi$ - $\pi$ -interaktion, grupp som  
kan utnyttjas vid hydrofob interaktionskromatografi,  
grupp som ger tiofila interaktioner, affinitetsbindande  
oorganiskt material såsom hydroxyapatit, etc.  
20
11. Superporöst polysackaridmaterial enligt något av kraven  
1-10, **kännetecknat** av att bikomponenten är porös med  
medelpordiametrar som är större än medelpordiametrarna i  
huvudkomponentens gelfas.  
25
12. Superporöst polysackaridmaterial enligt något av kraven  
1-11, **kännetecknat** av att det är i form av fibrer, kulor,  
eller en monolit, såsom ett membran eller en bädd.
- 30 13. Användning av det superporösa polysackaridmaterial  
enligt något av kraven 1-11 vid separationer, odling av  
celler, kemisk syntes, enzymatiska/katalytiska  
reaktioner.



Slutversion 1998-08-24

# S A M M A N D R A G

- Superporöst polysackaridmaterial som kännetecknas av att det ingår i en komposit som består av två eller flera
- 5 komponenter av vilka en är superporös polysackarid (huvudkomponent) med undantag av det fall att kompositen innehåller en elektriskt ledande monolitisk bikomponent som avses eller är kopplad mellan två elektroder.
- 10 Användning av det superporösa polysackaridmaterialet enligt ovan vid separationer, odling av celler, kemisk syntes, enzymatiska/katalytiska reaktioner.

